

## Avaliação da toxicidade aguda de nanopartícula de prata em tambaqui

MENESES, Shirley Avila<sup>1</sup>; CARVALHO, Amanda Silva<sup>2</sup>; SANTANA, Fabricio Sa<sup>3</sup>; SANTOS, Hugo Leandro<sup>4</sup>; SANTOS, Jéssica Maria Fontes<sup>5</sup>; MENESES, Juliana Oliveira<sup>6</sup>; FUJIMOTO, Rodrigo Yudi<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Graduanda em Zootecnia, Pibic/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Graduanda em Zootecnia, Pibic/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Graduando em Engenharia de Pesca e Aquicultura, Pibit/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup> Graduando em Engenharia de Pesca e Aquicultura, Pibit/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Graduanda em Engenharia de Pesca e Aquicultura, Pibit/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Engenheira de Pesca, Doutora em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

<sup>7</sup> Zootecnista, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa Aracaju, SE.

**Resumo** - O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade aguda de nanopartículas de prata em tambaqui *Colossoma Macropomum*. Para isso, foi realizada a síntese da nanopartícula de prata com 300mg de nitrato de prata dissolvido em 5 mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi adicionada outra solução contendo 95mL de álcool polivinílico sob agitação constante em temperatura de 80 °C. Para os ensaios de toxicidade, foi conduzido um experimento em sistema estático, em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco concentrações de AgNP **T1** (0,0625 mg/L), **T2** (0,125 mg/L), **T3** (0,1875 mg/L), **T4** (0,250 mg/L), **T5** (0,3125 mg/L) e três repetições. Também foi avaliado o sangue dos peixes moribundos e de todos ao final do experimento (duração total de 96 horas). O resultado obtido para concentração letal média (CL<sub>50-96h</sub>) foi de 0,165 mg/L (limite inferior de 0,141 mg/L e limite superior de 0,189 mg/L). O tratamento com maior concentração de nanopartículas também apresentou os maiores valores de glicose, proteína plasmática e eritrócitos. A nanopartícula de prata apresentou toxicidade classificada como alta para o tambaqui

**Termos para indexação:** nanoterapia, aquicultura; peixe redondo.

### Introdução

Comumente, piscicultores fazem o uso de quimioterápicos em seus cultivos para o controle da proliferação de agentes patogênicos (Banerjee; Ray, 2017). O uso indiscriminado destes produtos químicos resulta em resíduos deixados nos corpos hídricos sendo esse um dos principais fatores para promover a seleção de patógenos mais resistentes (Quesada et al., 2013). Como alternativa para minimizar impactos ambientais causados por produtos químicos usados para controle de patógenos, atualmente vem se usando cada vez mais nanotecnologia. Os nanoterápicos destacam-se pelo seu menor tamanho de partícula (1-100 nn) e maior eficácia. A nanopartícula de prata possui procedência de metais que são facilmente encontrados na natureza e apresentam características benéficas como ação antibacterianas e antifúngicas, com alta capacidade de se incorporar em materiais orgânicos (Andrade et al., 2013).

Dentre as nanopartículas, a nanopartícula de prata (AgNP) se destaca. Elas podem ser sintetizadas biologicamente, fisicamente e quimicamente. A ação antimicrobiana da AgNP é explicada pela sua aderência à membrana celular, degradando os lipopolissacarídeos formando cavidades na membrana que aumentam sua permeabilidade (Azeredo, 2009). Já dentro das células, a liberação de íons de prata convertem produtos metabólicos em radicais livres que causam estresse oxidativo resultando em danos ao DNA.

Quando analisado o uso do nitrato de prata em termos de toxicidade é reportado como uma substância mais tóxica para organismos fitoplanctônicos do que a nanopartícula de prata (Boenigk et al., 2014). Para o microcrustáceo daphnia, essa maior toxicidade é observada pelo nitrato de prata em concentrações de 0,5 a 3 µg/L em relação a nanopartículas de prata com 500 µg/L (Zhao; Wang, 2011). De acordo com Chernousova e Eppler (2013) estima-se que nanopartículas de prata apresentam 10 vezes menos toxicidade que nitrato de prata para células eucarióticas.

No entanto, para determinar as dosagens eficazes no controle in vivo de infecções, inicialmente são necessários ensaios toxicológicos para assegurar o uso da nanopartícula ou que permita determinar melhores estratégias de aplicação considerando a toxicidade do produto. Dessa forma a realização de teste de toxicidade pode mensurar o grau de respostas, pelo nível de concentração dos

compostos, estimando os efeitos sobre os organismos aquáticos (Tomita; Beyruth, 2003), auxiliando na proteção e monitoramento ambiental assim como caracterizando a seguridade de uso de novos produtos.

Esses testes de toxicidade aquática consistem em procedimentos nos quais as respostas dos organismos são utilizadas para a determinação de efeitos deletérios de qualquer substância, durante um período de tempo (César, 1997). Por essa razão se faz necessário avaliar a toxicidade aguda de nanopartículas de prata em tambaqui *Colossoma Macropomum*.

## Material e métodos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Aquicultura da EMBRAPA - Tabuleiros Costeiros (CEUA 030318R). Para a síntese da nanopartícula de prata, 300mg de nitrato de prata foi dissolvido em 5mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi adicionada (gota a gota) em outra solução contendo 95mL de álcool polivinílico a 5% sob agitação constante em temperatura de 80 °C. Ao final, esta solução foi aquecida durante 1 hora a 100°C no escuro para formação das nanopartículas estabilizadas (Meneses, 2017). A caracterização, morfologia e quantificação das nanopartículas foram previamente realizadas por Meneses (2017).

Para os ensaios de toxicidade, juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* foram conduzidos inicialmente a um teste de sensibilidade com KCl para determinar a sensibilidade do lote (Apha, 1991; Ibama, 1987). Os testes foram conduzidos com seis concentrações de KCl (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg/L), e duas repetições alocando 60 peixes em recipientes com capacidade para 5L na densidade de 1 peixe/litro. O teste teve duração de 96 horas determinando mortalidade diária dos peixes.

Para o teste definitivo de toxicidade aguda da nanopartícula de prata foi conduzido um experimento em sistema estático, em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco concentrações de AgNP **T1** (0,0625 mg/L), **T2** (0,125 mg/L), **T3** (0,1875 mg/L), **T4** (0,250 mg/L), **T5** (0,3125 mg/L) e três repetições. Foram utilizados 75 peixes com peso médio de 33,80 ±0,70 g em densidade de 1 peixe/litro por unidade experimental em recipiente com capacidade para 5 L toda avaliação durou 96 horas. Durante o teste os peixes ficaram em jejum. Diariamente foram avaliados os sinais clínicos, a mortalidade dos peixes e os parâmetros de qualidade de água. Os valores do CL<sub>50-96h</sub> foram determinados com auxílio do software *probit*.

Também foi avaliado o sangue dos peixes moribundos (caracterizados por natação mínima, perda de resposta a estímulos, batida opercular mínima) e dos peixes sobreviventes ao final do experimento, quanto aos parâmetros bioquímicos, eritrocitários e leucocitários. Para isso, os peixes foram anestesiados com eugenol (60 mg/L) e então procedeu-se a coleta de sangue dos vasos caudais com auxílio de seringas umedecidas com EDTA 10%. O número total de eritrócitos (cél.x 10<sup>6</sup>/μL), foi determinado em câmara de Neubauer, o percentual de hematócrito pelo método de microhematócrito e a concentração de hemoglobina (g/dL) com o auxílio do analisador bioquímico modelo LAB-TP 6000 PLUS. A concentração da glicose (mg/L) foi medida com Accu Chek® Active e os níveis plasmáticos de proteínas totais (g/L) com refratômetro modelo RHC-200/ATC. Também foram confeccionadas lâmina de extensão sanguínea coradas panoticamente para contagem total de trombócitos e a contagem diferencial de leucócitos (Ranzani-paiva et al., 2013). Também foram determinados os índices hematimétricos de: Volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), segundo descrito por (Tavares-dias et al., 2000, 2002).

## Resultados e discussão

Para o teste de sensibilidade com KCl, a concentração letal média (CL<sub>50-96h</sub>) foi de 1.57g/L, com limite superior de 1.86 g/L e limite inferior 1.33 g/L. No teste de toxicidade com nanopartícula de prata, os parâmetros de qualidade de água permaneceram estáveis: temperatura (27.64±0.13 °C), oxigênio dissolvido (5.44±0.36 mg/L), pH (6.56±0.09) e condutividade elétrica (147.84±1.23 μS/cm<sup>3</sup>). E o final do experimento de toxicidade com nanopartícula de prata, o resultado obtido para concentração letal média (CL<sub>50-96h</sub>) foi de 0,165 mg/L (limite inferior de 0,141 mg/L e limite superior de 0,189 mg/L).

Segundo Zucker (1985) a nanopartícula pode ser classificada como altamente tóxica. Estudos com os peixes *Danio rerio*, *Carassius auratus* (Kiruba Daniel et al., 2011) e *Cyprinus carpio* (Lee et al., 2012) apresentaram respostas deletérias quando expostos a 0,160 mg/L a 0200 mg/L de

nanopartículas de prata o que corrobora os dados encontrados no presente trabalho mesmo em espécies tropicais como o tambaqui. Ao analisar os parâmetros sanguíneos, a glicemia não diferiu estatisticamente com o aumento das concentrações, mas a proteína plasmática apresentou diferença com concentração mais alta de nanopartícula. O aumento de proteína plasmática no sangue pode ser uma resposta ao estresse com o aumento de concentrações de nanopartículas de prata, pois o organismo estaria usando proteínas como fonte de energia para manter o metabolismo (Ramesh et al., 2009). Nas células vermelhas, os valores de eritrócito, hemoglobina e hematócrito aumentaram ( $p < 0.05$ ) em função das concentrações de prata. O mesmo ocorreu em estudos realizados por Imani et al. (2014), mostrando um aumento de eritrócitos e hemoglobina em concentrações de 0,2 e 0,4mg/L de nanopartículas prata. De acordo com Atamanalp et al. (2011) esse aumento de células seria uma resposta a deficiência de transporte de oxigênio em peixes expostos a poluentes ou metais pesados. Contudo, os dados de VCM, HCM, CHCM, não mostraram diferença estatísticas possivelmente descartando a hipótese de hipóxia. Possivelmente ocorreu alterações a nível molecular com o tecido hematopoiético do peixe devido as altas concentrações de nanopartículas de prata (Chi et al., 2018)

Para as células brancas, apenas neutrófilos apresentaram aumento significativo para o tratamento 5, as demais células de defesa se mantiveram sem diferença significativas. Para Saravanan (2015) em estudos com nanopartículas de ferro, em concentrações de 1 mg/L também foi encontrado aumento no número de células de defesa. Vale (2020) também encontrou resultados semelhantes em concentrações subletais de nanopartículas de prata (Ag-Nps) na carpa comum, demonstrando aumento de neutrófilo. Os neutrófilos são as primeiras células de defesa do organismo para o controle de alguma infecção. Normalmente são relacionados a função de fagocitose de corpos estranhos (a exemplo das AgNP) presentes no sangue circulante (Ranzani-Paiva et al., 2013), o que explicaria os maiores valores apenas dessa célula como resposta aguda.

## Conclusões

A nanopartícula de prata apresentou toxicidade classificada como alta que induzirá em estudos futuros a avaliação de diferentes estratégias de aplicação para o tratamento de doenças em peixes. As avaliações hematológicas indicaram alterações no número de células de defesa como mecanismos de defesa aos efeitos tóxicos da prata.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos ao Projeto BRS Aqua, parceria celebrada entre o BNDES, FEA e Embrapa, com aporte de recursos do BNDES, SAP/MAPA, contrapartida da Embrapa e apoio do CNPq.

## Referências

- ANDRADE, D. A. de. **Síntese de nanopartículas de ferrita de cobalto em solução de laponita**. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, DF, 2013.
- BANERJEE, G.; RAY, A.K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 66-77, 2017.
- BANERJEE, P.; SATAPATHY, M.; MUKHOPADHAYAY, A.; DAS, P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2014.
- BOENIGK, J.; BEISSER, D.; ZIMMERMANN, S.; BOCK, C.; JAKOBI, J.; GRABNER, D.; SURES, B. Effects of silver nitrate and silver nanoparticles on a planktonic community: general trends after short-term exposure. **PloS one**, v. 9, n. 4, e95340, 2014.
- CESAR, A. **Testes de toxicidade aquática no controle da poluição** - Universidade Santa Cecília - UNISANTA - Santos, São Paulo, Brasil, fevereiro de 1997. 37 p.
- AZEREDO, H. M. C. de. Nanocomposites for food packaging applications. **Food research international**, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, 2009.

- PAIVA, M. de et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013.
- MBHELE, Z. H. et al. Fabrication and characterization of silver – polyvinyl alcohol nanocomposites. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 26, p. 5019-5024, 2003.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doença de peixes, profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Eduem, 2008.. 311 p.
- PENCHEVA, D.; BRYASKOVA, R.; KANTARDJIEV, T. Polyvinyl alcohol/silver nanoparticles (PVA/AgNps) as a model for testing the biological activity of hybrid materials with included silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C** 2012; 32(7): 2048-2051.
- QUESADA, S. P.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones—a review. **Journal of food science**, v. 78, n. 9, p. R1321-R1333, 2013.
- TAVARES-DIAS, M. et al. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivada intensivamente em pesque-pague do município de Franca, SP, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 16, p. 76-82, 2000a.
- TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **O Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.
- ZUCKER, E. (1985). **Hazard evaluation division: standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater fish**. USEPA publication 540/9-85-006, Washington, 17 p.